

GISLAINE NONINO ROSA

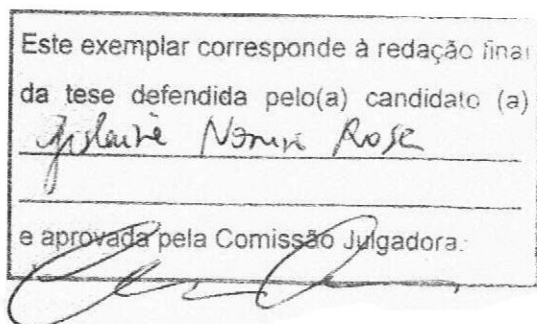
**“CINOMOSE CANINA: DETECÇÃO E ANÁLISE
FILOGENÉTICA DO GENE HEMAGLUTININA (H) EM
AMOSTRAS CLÍNICAS E NECROSCÓPICAS”**

**Campinas
2007**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

GISLANE NONINO ROSA

**“CINOMOSE CANINA: DETECÇÃO E ANÁLISE
FILOGENÉTICA DO GENE HEMAGLUTININA (H) EM
AMOSTRAS CLÍNICAS E NECROSCÓPICAS”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. _____

Clarice Weis Arns

**Campinas
2007**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R71c Rosa, Gislaine Nonino, 1974-
Cinomose canina : detecção e análise filogenética do gene hemaglutinina (H) em amostras clínicas e necroscópicas / Gislaine Nonino Rosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2007.
Orientador: Clarice Weis Arns.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Cinomose. 2. Hemaglutinina. 3. Genótipo. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Canine distemper : detection and phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene (H)

Palavras-chave em inglês:

Distemper

Hemagglutinin

Genotype

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Maria Silvia Viccari Gatti

João Pessoa Araújo Junior

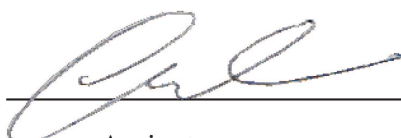
Data de defesa: 16-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

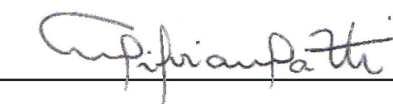
Campinas, 16 de Fevereiro de 2007.

Banca Examinadora

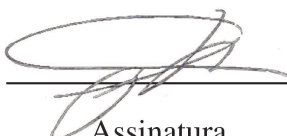
Profa Dra Clarice Weis Arns (Orientadora)


Assinatura

Profa Maria Silvia Viccari Gatti


Assinatura

Prof Dr João Pessoa Araújo Junior


Assinatura

Trabalho realizado no Laboratório de
Virologia Animal do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESTRUTURA VIRAL.....	1
1.2. VARIABILIDADE GÊNÉTICA.....	3
1.3. EPIDEMIOLOGIA	4
1.4. SINAIS CLÍNICOS E PATOGÊNESE	5
1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIA.....	5
1.5.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)	7
1.5.2. SOROLOGIA	8
1.5.3. ISOLAMENTO VIRAL.....	8
1.5.4. RT-PCR	9
1.6. CONTROLE E PROFILAXIA.....	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	12
3.2. AMOSTRA VIRAL PADRÃO.....	12
3.3. AMOSTRA VIRAL PARA CONTROLE DE ESPECIFICIDADE.....	13
3.4. AMOSTRAS DE TECIDOS E SECREÇÕES	13
3.4.1 AMOSTRAS ANTE MORTEM	13
3.4.2 AMOSTRAS POST MORTEM.....	13
3.5. AMOSTRA TECIDUAL PARA CONTROLE DE SENSIBILIDADE....	14
3.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	16
3.6.1 TECIDOS.....	16

3.6.2	URINA.....	16
3.6.3	LÍQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	16
3.7.	ISOLAMENTO VIRAL	16
3.8.	PADRONIZAÇÃO DO RT-PCR.....	17
3.8.1.	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	17
3.8.1.1.	TÉCNICA TRIzol® REAGENT (INVITROGEN, CA-USA).....	17
3.8.1.2.	TÉCNICA “HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID” – (ROCHE®).....	17
3.8.2.	SÍNTESE DE cDNA.....	18
3.8.3.	REAÇÃO DE PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE H	18
3.9.	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	20
3.10.	ANÁLISE FILOGENÉTICA	20
4.	RESULTADOS	21
4.1.	ISOLAMENTO VIRAL	22
4.2.	RT-PCR	22
4.3.	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	28
5.	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÕES.....	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Agradecimentos

Agradeço...

Ao Felipe, “meu pequeno grande amor”...

À minha mãe, Rita, meu maior exemplo de honestidade, humildade e coragem,

Ao meu pai e meus avós, por estarem sempre me acompanhando,

À professora Clarice, pela confiança.

Aos meus amigos de LVA: Lia, Regis, Rods, Paulo Anselmo, Caio, Luciana, Maria Ângela, Paula e Geneci. Obrigada por tantas ajudas, obrigada pelas conversas à toa nos botecos da vida...

À Lourdes (pós-graduação), por toda atenção e dedicação,

Ao Fer (Spilki), por tudo que me ensinou. Obrigada,

Aos meus amigos de vida, sem vocês certamente não chegaria aqui. Amo Vocês.

- Renata: “Neguinha” como sinto sua falta
- Lica: apesar das diferenças aprendi muito com você
- Helena: “Lajota” quanto rimos, choramos e aprendemos juntas. “Porque a vida tem que ser celebrada”
- Márcia: “Marciolina”, adoro você!

- Érica: pelas brigas, pela paciência...
- Débora: às vezes acho que já nos conhecemos amigas.

Aos colegas do Hospital Veterinário Campinas,

Aos colegas do Hospital Veterinário Dr. Eike Bukcholts,

Enfim, a todos que direta e indiretamente ajudaram na execução desta tese.

“Cinomose Canina: Detecção e análise filogenética do gene hemaglutinina (H) em amostras clínicas e necroscópicas”

Resumo

A cinomose canina tem sido relatada como uma das mais importantes doenças infecto contagiosas dos canídeos selvagens e domésticos. É causada por um agente viral denominado vírus da cinomose canina (CDV). Os vírus pertencem à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*. São vírus envelopados, com genoma composto por uma fita simples de RNA, polaridade negativa, não segmentado. Alto grau de variabilidade genética no gene da hemaglutinina (H) tem sido encontrada entre estirpes virais recentes e vacinais, e estas variações podem estar relacionadas ao aumento da ocorrência global da cinomose. No presente estudo, amostras biológicas de cães com sintomatologia sugestiva da cinomose foram analisadas geneticamente. Para a detecção de um fragmento de 882 pb do gene H do CDV padronizou-se uma RT-PCR que mostrou-se capaz de amplificar o material genético viral em amostras de urina, líquido céfalo-raquidiano, sistema nervoso central (SNC), baço, pulmão, fígado, rins, linfonodos, bexiga e timo. As amostras positivas de acordo com a RT-PCR foram encaminhadas para o sequenciamento e análise filogenética. Os resultados encontrados sugerem que estas amostras assemelham-se geneticamente aos vírus agrupados nas linhagens Européia e Ásia-1. A estirpe vacinal Lederle, utilizada como padrão, foi agrupada junto a linhagem América-1 onde encontram-se todas as estirpes vacinais, também conhecidas como “Old CDVs”. Os achados deste trabalho apontam para a ocorrência de estirpes geneticamente

distintas daquelas utilizadas na produção de vacinas e mais estudos são necessários para a avaliação da eficácia das vacinas disponíveis, propiciando um melhor controle da doença.

"Canine Distemper : Detection and phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene (H) in clinical samples and necroscopical"

Abstract

Canine distemper has been reported as one of the most important infectious diseases of wild and domestic canids. It is caused by a viral agent called canine distemper virus (CDV). Viruses belonging to the family Paramyxoviridae, genus Morbillivirus. They are enveloped viruses with genome composed of a single strand of RNA, negative polarity, not segmented. High degree of genetic variability in the gene for hemagglutinin (H) has been found between recent viral strains and vaccination strains, and these variations may be related to increased overall occurrence distemper. In this study, biological samples from dogs with symptoms suggestive of distemper were analyzed genetically. For the detection of a 882 base pairs (bp) fragment of the gene of CDV H was standardized a RT-PCR which proved to be capable of amplifying the viral genetic material in urine, cerebrospinal fluid, central nervous system (CNS), spleen , lungs, liver, kidneys, lymph nodes, bladder and thymus. Positive samples according to RT-PCR were sent for sequencing and phylogenetic analysis. The results suggest that these samples are similar to viruses genetically clustered lineages in European and Asia-1. The Lederle vaccine strain, used as standard, was grouped with Latin-1 lineages which are all vaccine strains, also known as "old CDVs." The findings of this study point to the occurrence of genetically distinct strains from those used in vaccine production and more studies are needed to assess the efficacy of vaccines available, providing better control of the disease.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina ou canine distemper virus (CDV) é o agente etiológico da cinomose canina ou canine distemper (CD), umas das mais importantes doenças virais de canídeos selvagens e domésticos. Estes vírus possuem um amplo espectro de outros hospedeiros como membros das famílias *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Viverridae*, *Hyaenidae*, *Felidae* (Pardo, *e col.* 2005; Appel *e col.*, 1994; Evermann *e col.*, 2001; van de Bildt *e col.*, 2002).

Os CDV, assim como os vírus do sarampo humano (Measles Vírus -MeV), da peste bovina (Bovine Rinderpest Vírus - RPV), vírus da cinomose das focas (Phocine Distemper Vírus - PDV), vírus da peste dos pequenos ruminantes (Peste-des-Petits- Ruminants Vírus - PPRV) e morbilivírus dos cetáceos, pertencem a família *Paramixoviridae*, ordem *Mononegavirales* e gênero *Morbillivirus* (Martella *et col.*, 2006).

1.1. Estrutura Viral

Os CDVs são vírus envelopados, pleomórficos, relativamente grandes, cujo diâmetro varia de 150 a 300 nm. Seu genoma é composto por uma fita simples de RNA, com polaridade negativa, não segmentado, constituído de 15690 nucleotídeos (Murphy *e col.*, 1999).

Estruturalmente o RNA genômico é envolvido pela nucleoproteína (NP), que serve como molde para transcrição e replicação viral, juntamente com as proteínas polimerase (L) e fosfoproteína (P). Essas três proteínas associadas ao RNA formam o complexo ribonucleoproteína (RNP), o qual direciona a síntese do mRNA ou a replicação de todo

antigenoma (**Figuras 1 e 2**, Pardo *e col.*, 2005; Von Messling *e col.*, 2001; Sidhu *e col.*, 1995).

No envelope viral encontram-se a proteína de fusão (F) e a hemaglutinina (H), além de uma proteína associada à membrana, a proteína matrix (M) (Cathomen *e col.*, 1998).

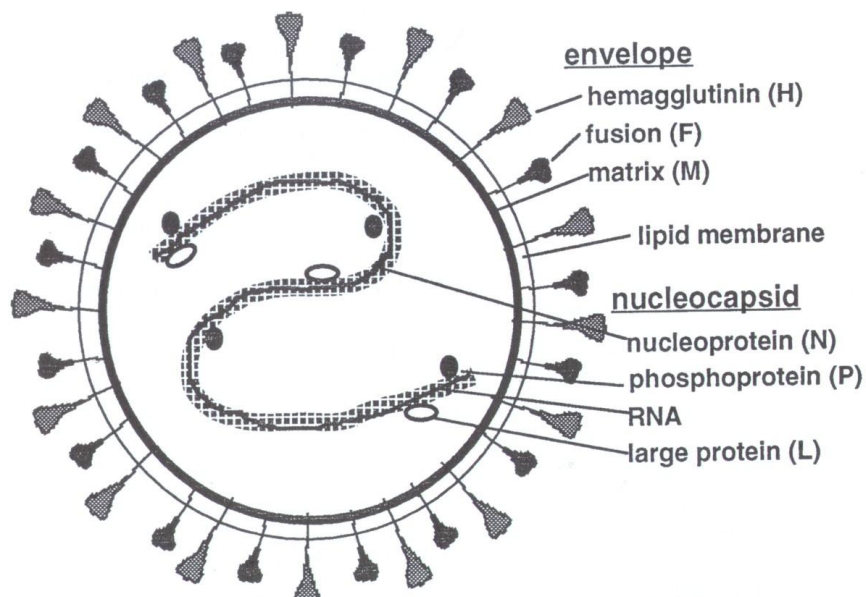


Figura 1: Ilustração da estrutura do CDV (Griffin & Bellini, 1996).

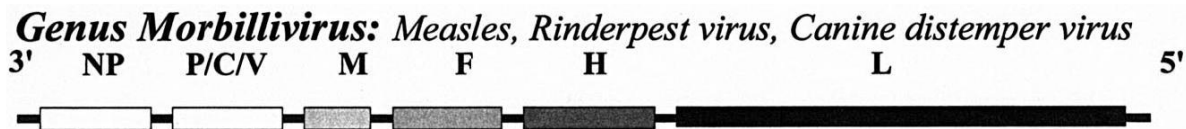


Figura 2: Ilustração do genoma do CDV (Easton *e col.*, 2004).

A glicoproteína H é responsável pela ligação do vírus à membrana celular hospedeira e a proteína F promove a fusão das duas membranas, possibilitando a entrada do complexo RNP para o citoplasma da célula (Lamb, R. A., 1993). Acredita-se que a proteína H seja o principal antígeno viral envolvido com a resposta imunológica ao vírus e, sua alta variabilidade genética

faz com que seja a mais apropriada proteína a ser monitorada na detecção de mudanças genéticas nesses vírus (Blixenkrone-Moller *e col.*, 1992; Martella *e col.*, 2002). Essa extensa variabilidade genética permite a distinção de várias linhagens virais agrupadas de acordo com as características geográficas de distribuição e espécies acometidas (Martella *e col.*, 2006). Ainda, a glicoproteína H é a maior determinante do tropismo e citopatogenicidade viral (Von Messling *e col.*, 2001). Assim a caracterização genética do gene H é de grande utilidade para a análise filogenética dos CDV (Lan *e col.*, 2006).

1.2. Variabilidade Genética

A maior variabilidade genética do CDV tem sido encontrada na proteína H, o que faz dela a proteína mais adequada a ser monitorada para a detecção de mudanças genéticas no vírus. Estudos feitos em países europeus, nos Estados Unidos (EUA) e no Japão relatam pronunciada diversidade genética no gene H em isolados virais recentes, também conhecidos como “novos CDVs” quando comparados às estirpes vacinais Onderstepoort e Convac, “velhos CDVs”, produzidas nas décadas de 1950 e 1960 (Mochizuki *e col.*, 1999).

A análise filogenética do gene H dos “novos CDVs” tem revelado linhagens geograficamente distintas, as quais não são agrupadas exclusivamente de acordo com a espécie hospedeira. Atualmente, os “novos CDVs” têm sido agrupados nas linhagens Européia, Ásia-1, Ásia-2, Ártica, América -1, América-2 e Europa-selvagem (Mochizuki *e col.*, 1999; Haas *e col.*, 1997; Harder *e col.*, 1996; Iwatsuki *e col.*, 1997).

Mochizuki *e col.*, 1999, propõem o uso do termo genótipo para amostras agrupadas em um mesmo ramo na árvore filogenética e que mostrem mais que 95% de similaridade na sequência deduzida de aminoácidos.

Pardo *e col.* (2005), pela análise filogenética dos genes H e F de vírus isolados a partir de cães naturalmente infectados por CDV, mostraram estirpes geneticamente distintas daquelas já encontradas nos Estados Unidos. Tais estirpes apresentavam similaridades com as estirpes Asiáticas e Européias. Sugeriram então que os vírus isolados naquele estudo teriam sido originados de espécies não caninas, ou seja, poderia estar havendo transmissão do CDV de cães para outras espécies animais e vice-versa. Através do sequenciamento genético parcial do gene H de um isolado do mesmo lote vacinal usado em um dos cães em estudo, descartaram a possibilidade de reversão de virulência do vírus vacinal, dada a distância genética entre eles.

Martella *e col.* (2006), a partir da análise filogenética da proteína H de amostras detectadas em material neurológico de cães com sintomas sugestivos de cinomose na Itália, encontraram duas estirpes de CDV incomuns e geneticamente distintas daquelas circulantes naquele país e no continente Europeu.

1.3. Epidemiologia

O CDV apresenta distribuição global, sendo a cinomose uma doença enzoótica mundial (Sherding, 1998).

Conhecido por causar uma doença potencialmente letal em membros das famílias *Canidae*, *Mustelidae* e *Procyonidae*, o CDV, atualmente, tem sido detectado como causa de morbidade e mortalidade em grandes felídeos, focas e outros animais. Esses vírus foram responsáveis pela morte de mais de 10000 focas no ano de 2000, dizimou cães selvagens na África e matou 1/3 dos leões do Serengeti em 1994 (Lednicky *e col.*, 2004b).

Em caninos, os CDVs acometem animais de todas as idades, sendo a maior incidência em filhotes não vacinados, com idade entre 3-4 meses, período em que ocorre a diminuição da imunidade materna (Kim *e col.* 2006; Sherding, 1998).

Os animais infectados eliminam os vírus em todas as secreções e excreções corporais, sendo, portanto, locais de aglomeração de animais como lojas de animais, feiras, exposições, canis e abrigos considerados ambientes favoráveis à disseminação viral (Sherding, 1998).

1.4. Sinais Clínicos e Patogênese

A cinomose canina é uma doença altamente contagiosa, aguda ou subaguda, com sinais de infecção generalizada, hiperqueratose de coxins plantares, distúrbios neurológicos ou uma combinação destes sinais (Krakowka *e col.*, 1985; Appel & Summers, 1995; Lan *e col.*, 2006).

Os principais alvos para os vírus são as membranas mucosas e tecidos linfóides. Após a infecção, que ocorre por meio da inalação de aerossóis, o CDV replica-se primariamente nos tecidos linfóides do trato respiratório e, a partir daí alcança vários órgãos, incluindo células do trato respiratório inferior e trato gastrintestinal, órgãos linfóides, bexiga urinária e sistema nervoso central (Appel, 1987).

A infecção manifesta-se de forma subclínica, clínica ou crônica, onde ocorre uma combinação de sinais respiratórios, gastrintestinais, neurológicos, cutâneos e oculares, os quais aparecem simultaneamente ou não (Greene & Appel, 1998).

Os sinais neurológicos podem estar presentes na forma crônica da doença, podendo ser acompanhando de outras manifestações clínicas, ou acontecer sem qualquer outro sinal clínico sistêmico (Appel, 1987, Baumgärtner *e col.*, 1989).

As variações das formas de manifestações clínicas da cinomose canina depende do título e estirpe viral infectante e da idade e perfil imunológico do indivíduo acometido (Appel *e col.*, 1969). Em geral os sinais clínicos são multissistêmicos e variados, a saber: anorexia, depressão, febre, rinite, conjuntivite, pneumonia, vômito, diarreia, ceratoconjuntivite, corio-retinite, neurite óptica, convulsões, andar em círculos, alterações comportamentais, ataxia, paresia, propiocepção anormal, neuropatias periféricas e cranianas, mioclonias, hiperqueratose de coxins podais, pústulas abdominais, entre outros (Sherding, 1998). Sendo os sinais gastrintestinais e respiratórios conhecidos como sinais sistêmicos ou epiteliais da doença.

Três síndromes clínicas estão relacionadas à infecção pelo CDV em cães: encefalite do cão idoso (ODE); encefalomielite multifocal dos cães adultos (MDEMD) e a encefalomielite dos cães jovens (CDEID), sendo esta última a forma mais comum e que normalmente é precedida ou concomitante a sinais extraneurais. Nas outras duas, com menor incidência, os sinais sistêmicos usualmente são ausentes (Braund, 1994).

As manifestações neurológicas são decorrentes de uma neuropatia desmielinizante multifocal que, na fase aguda, é induzida diretamente pela presença do vírus e normalmente seguida de um estágio crônico onde há o predomínio de uma forte resposta inflamatória intratecal (Appel *e col.*, 1972; Vandeveld *e col.*, 1995; Zurbriggen *e col.*, 1998).

Aparentemente, as estirpes virais que induzem doença de curso agudo fatal localizam-se na substância cinzenta e determinam destruição neuronal, resultando em encefalomalácia. As estirpes virais que induzem doença crônica ocasionam lesões que tendem a se localizar na substância branca, promovendo desmielinização (Wild *e col.*, 1995; Amude *e col.*, 2006c).

Krokowka *e col.* (1987), sugerem que durante a viremia o CDV infecta o SNC na maioria dos casos, se não em todos, independente da manifestação clínica da doença.

1.5. Diagnóstico Laboratorial

Uma variedade de parâmetros clínicos e diferentes métodos têm sido propostos para o diagnóstico definitivo *antemortem* da cinomose. Entretanto, devido ao curso imprevisível e variável da doença, ou seja, duração da viremia, manifestações multissistêmicas e resposta imune humoral e celular ausentes ou tardias, o diagnóstico final permanece inconclusivo na maioria dos casos (Frisk *e col.*, 1999). Amostras clínicas ou necroscópicas variadas têm sido usadas, sendo elas: soro, sangue total, líquido céfalo-raquidiano, “imprints” conjuntival e vaginal, células do epitélio urinário, pele, biópsia de estômago, células de lavado traqueal (Alldinger *e col.* 1993; Sidhu *e col.*, 1993), assim como amostras de órgãos colhidas durante exame necroscópico, sendo elas: baço, bexiga, pulmão, linfonodo mediastinal (Rzezutka & Mizak, 2002), cérebro e cerebelo (Moro *e col.*, 2003).

1.5.1. Imunofluorescência (IF)

A imunofluorescência (IF) pode ser aplicada a várias amostras clínicas (suabes conjuntival, nasal e vaginal) utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais. Entretanto, esta técnica detecta antígenos virais apenas nas três primeiras semanas pós infecção, quando o

vírus ainda encontra-se presente em células epiteliais (Appel, 1987). Nas fases subagudas e crônicas da doença esta técnica pode gerar resultados falso-negativos (Jó'zwik & Frymus, 2005).

1.5.2. Sorologia

Métodos sorológicos, como ELISA e soroneutralização (SN), apresentam pouco valor diagnóstico. Altos títulos de anticorpos anti-CDV resultantes de vacinação prévia, infecção ativa clínica ou subclínica ou transferência passiva de anticorpos maternos (Shin *e col.*, 1995; Frisk *e col.*, 1999; Kim *e col.*, 2001). Por outro lado, em casos severos da doença, o título de anticorpos pode estar baixo devido à característica imunossupressiva do vírus (Amude *e col.*, 2006a).

1.5.3 Isolamento Viral

O diagnóstico definitivo a partir do isolamento viral em cultivos celulares é fastidioso e demorado, levando de muitos dias a semanas, principalmente quando usado para amostras clínicas (Shin *e col.*, 1995; Frisk *e col.*, 1999; Kim *e col.*, 2001).

O efeito citopático (ECP) característico de todos os morbillivirus é a formação de sincícios, ou seja, a capacidade do vírus em induzir a fusão de membranas celulares facilitando sua propagação célula a célula, mecanismo este determinado pela proteína H (Shin *e col.*, 1997; Schmid *e col.*, 2000)

Propõe-se o uso de cultivo primário de células caninas (macrófagos pulmonares, fibroblastos, células SNC) ou células de linhagem (MDCK, Vero) para inoculação de

suspensão de órgãos ou células de animais doentes (Appel & Gillespie, 1972; Visser *e col.*, 1990). Entretanto, o isolamento do CDV em cultivos celulares tende a ser demorado (às vezes maior que trinta dias), requerendo múltiplas passagens cegas antes que o crescimento viral seja evidenciado pela formação de efeito citopático (ECP), sendo que, nem todas as células desenvolvem ECP quando infectadas com CDV (Appel, 1987).

Diferentes linhagens celulares como a B95a, Vero e Vero-DST têm sido utilizadas para o isolamento de novas estirpes de CDV, todavia o efeito do tipo celular sobre a expressão gênica do vírus precisa ser considerado (Seki *e col.*, 2003).

Lednicky *e col.* (2004a) testaram as linhagens celulares Vero; MDCK e MV1 Lu para o isolamento de CDV a partir de amostras tecidos de guaxinins. Utilizando uma RT-PCR para o gene P, o vírus foi detectado mais precocemente na linhagem MDCK (trinta dias pós infecção), enquanto que o ECP mais evidente foi visualizado em células Vero.

Seki *e col.* (2003) desenvolveram células Vero expressando um receptor celular para morbilivírus (SLAM ou CD150), a qual se mostrou altamente sensível para a detecção de CDV a partir de amostras clínicas com precoce aparecimento de ECP (vinte e quatro horas pós-inoculação). Lan *e col.* (2005) sugerem que esta molécula é o mais importante receptor da célula hospedeira para a proteína H do CDV.

1.5.4 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase seguida da transcriptase reversa (RT-PCR), por tratar-se de um método rápido, sensível e específico, tem sido utilizada com êxito no diagnóstico do CDV (Frisk, *e col.*, 1999; Von Messling *e col.*, 1999; Rzezutka & Mizak, 2002;

Saito *e col.*, 2006; Shin *e col.*, 2004), sendo utilizada com sucesso no diagnóstico *ante e post mortem* da cinomose em cães (Frisk *e col.*, 1999; Gebara *e col.*, 2004; Amude *e col.*, 2006b).

A sensibilidade, especificidade e rapidez da RT-PCR, comparadas aos métodos diagnósticos tradicionais, como microscopia eletrônica, isolamento viral, imunofluorescência e ELISA fazem dela o teste de eleição para o diagnóstico conclusivo da cinomose (Elia *e col.*, 2006).

Kim *e col.* (2006) fizeram um estudo comparando diferentes amostras obtidas de secreções (sangue total periférico, suabe conjuntival, lavado nasal e urina) visando a detecção precoce do CDV a partir de cães infectados experimentalmente. Utilizando uma RT-PCR para amplificação de uma sequência do gene NP, avaliaram amostras colhidas diariamente do primeiro ao décimo-quarto dia pós-infecção. Amostras de suabes conjuntivais de todos os cães testados geraram resultados positivos nos quinze dias avaliados. Em amostras de urina o vírus foi detectado em todos os indivíduos apenas no sexto dia pós-infecção. Nenhum produto foi gerado pela RT-PCR em amostras de líquido céfalo-raquidiano durante o período avaliado. Os autores sugerem que amostras de suabe conjuntival constituem uma opção conveniente para o diagnóstico precoce do CDV.

Saito *e col.* (2006), avaliaram o uso de amostras de urina para a detecção do CDV utilizando uma RT-PCR para um fragmento do gene NP e compararam com amostras de soro, leucócitos e LCR. Resultados positivos foram encontrados em todas as amostras de urina testadas.

Elia *e col.* (2006), padronizaram um real-time PCR para CDV e encontraram RNA viral em tecidos linfóides (baço, linfonodo, timo), bexiga, rins, coração, fígado, testículos, pulmão (lobo cranial), medula espinhal, medula óssea, coxins plantares, pele, tecido muscular, cérebro (lobo frontal e temporal), urina, sangue e suabe conjuntival.

1.6. Controle e Profilaxia

O uso de vacinas anti-CDV, a partir de vírus vivo modificado, tem ajudado a manter a doença sob controle desde sua introdução na década de 1950 (Appel, 1987; Appel & Summers, 1995; Greene *e col.*, 1998). Contudo, nos últimos anos, a incidência da cinomose em cães tem aumentado de forma global e muitos episódios da doença em cães vacinados têm sido relatados (Gemma *e col.*, 1996; Blixenkrone-Moller *e col.*, 1993; Lan *e col.*, 2006; Elia *e col.*, 2006). Este fato pode estar associado a reversão da virulência dos vírus vacinais ou pode ser resultado de infecção a partir de vírus selvagens (Lan *e col.*, 2006).

Pardo *e col.* (2005) sugerem que falhas vacinais, reversão da virulência nas estirpes vacinais atenuadas ou a emergência de novas estirpes, capazes de evadir da proteção do sistema imune, poderiam explicar a ocorrência da doença em populações de cães vacinados. Hashimoto *e col.* (2001) citam que muitos cães vacinados infectados com CDV apresentam sinais típicos da doença.

Lan *e col.* (2006), através de sequenciamento e análise filogenética compararam vírus isolados a partir de três cães com sinais clínicos de cinomose e previamente vacinados com um vírus vacinal isolado de uma vacina comumente utilizada no Japão. A distante relação genética encontrada entre a estirpe vacinal e as isoladas dos animais doentes, mostraram claramente não se tratar de um caso de reversão da virulência do vírus vacinal.

Portanto, considerando a natureza contagiosa associada à alta taxa de mortalidade da cinomose, faz-se necessária a rapidez nos procedimentos diagnósticos para que os animais infectados possam ser isolados e submetidos a protocolos terapêuticos adequados (Elia *e col.*,

2006). Ainda, tratando-se de uma doença de caráter endêmico, a cinomose deve ser considerada como um diagnóstico diferencial em qualquer caso clínico onde haja ocorrência de sinais neurológicos, mesmo na ausência de sinais sistêmicos e/ou mioclonias associados (Amude *et al.*, 2006c).

2. OBJETIVOS

- Tentativa de isolamento viral a partir de amostras clínicas de animais supostamente infectados;
- Padronização da técnica de RT-PCR para a detecção do gene H do CDV;
- Sequenciamento e análise filogenética dos produtos amplificadas pela RT-PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Foram utilizadas linhagens contínuas de células MDCK (Mardin-Darbin Canine Kidney), gentilmente cedidas pelo Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF), RS, cultivadas em garrafas de 75cm² (Corning), na concentração de $1,3 \times 10^5$ células/ml em meio essencial Eagle (MEM-E) (Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma Chemical Company), por 24h a 37°C.

3.2. Amostra Viral Padrão

Foi utilizada como amostra padrão do CDV a estirpe vacinal Lederle (CDV-LD) gentilmente cedida pelo Laboratório BIOVET.

3.3. Amostra Viral Para Controle de Especificidade Analítica

Foi utilizada para controle de especificidade analítica da técnica de RT-PCR uma amostra do Vírus da Parainfluenza Canina Tipo-2 (CPiV2), gentilmente cedida pelo CPVDF. Trata-se de um paramixovírus, do gênero Rubulavirus e um importante agente etiológico de doença respiratória em cães.

3.4. Amostras de Tecidos e Secreções

3.4.1. Amostras Ante-Mortem

Foram colhidas quatro amostras de líquido céfalo-raquidiano e uma amostra de urina de quatro cães, com sinais clínicos sugestivos de cinomose, durante o período de internação hospitalar. Posteriormente, esses indivíduos foram eutanasiados em consequência do agravamento dos sintomas. Cada indivíduo foi identificado por numeração crescente, precedido da sigla LVA-C (Laboratório de Virologia Animal-Canino). Foram eles: LVA-C 19; LVA-C 21; LVA-C 23; LVA-C 24 (**Quadro 1**).

3.4.2. Amostras Post-Mortem

Foram obtidas amostras de tecidos com origem histológica pré determinada (pulmonar, esplênica, linfática, vesical, neurológica, hepática, renal e tímica), proveniente de quinze cães

que foram submetidos à eutanásia em função de sintomas clínicos e dados de anamnese sugestivos de cinomose. As amostras foram colhidas durante exame necroscópico, identificadas por numeração crescente, natureza histológica, precedido da sigla LVA-C e acondicionado a -80°C até o processamento.

3.5. Amostra Tecidual Para Controle de Sensibilidade Analítica

Foi utilizado para controle de sensibilidade analítica da técnica de RT-PCR amostra de tecido neurológico de um indivíduo (LVA-C 26) que veio a óbito apresentando sintomas sugestivos de cinomose, porém com diagnóstico definitivo de cirrose hepática obtido através de achados necroscópicos e exame histopatológico de tecido hepático. Esse animal havia recebido, sessenta dias antes do óbito, reforço vacinal anual com uma vacina polivalente, que entre outros, continha antígeno atenuado para o CDV da estirpe Snyder Hill. (**Quadro 1**).

Quadro1: Relação das amostras de tecidos e secreções; dados clínicos e vacinais dos indivíduos selecionados para o presente estudo.

INDIV	DADOS CLÍNICOS	STATUS	AMOSTRA
VACINAL			
LVA-C 04	14 meses	desconhecido	Ba; Pul; Ln mediastinal
LVA-C 05	Convulsões; mioclonias; paresia MPs	desconhecido	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC
LVA-C 06	Convulsões; mioclonias; paresia MPs	desconhecido	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC
LVA-C 09	Convulsões; mioclonias; paresia MPs	desconhecido	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC
LVA-C 10	24 meses; corrimento naso-ocular; leucopenia	atraso 16 meses	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC; Bx
LVA-C 13	36 meses; corrimento naso-ocular; tosse esporádica; mioclonias; paralisia MPs; vocalização	sem vacinas	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC
LVA-C 17	Sinais neurológicos	desconhecido	Ba; Pul; Ln mediastinal; SNC; Bx
LVA-C 18	2 meses; convulsões; ataxia MPs; mioclonias,	sem vacinas	SNC
LVA-C 19	ectoparasitose; subnutrição 4 meses; sinais gastroentéricos; convulsões; mioclonias MAs; pústulas abdominais	2 doses vacinas polivalente (60- 90dias)	Ba; Pul; Ln; SNC; Bx; LCR
LVA-C 20	3 meses; convulsões; mioclonias; secreção naso-ocular; pústulas abdominais; gastroenterite	desconhecido	Ba; Pul; SNC; Bx
LVA-C 21	4 anos; nistagmo horizontal; ausência de propriocepção 4 membros; mioclonia temporal e palpebral; hiperreflexia; hiperacusia	desconhecido	Ba; Pul; SNC; Bx; LCR
LVA-C 22	4 meses, sinais gastroentéricos; respiratórios; hiperalgesia; vocalização; mioclonais MAs; subdesenvolvimento; procedência SC	2 doses vacinas polivalente (60; 90 dias)	Ba; Pul; Ln; SNC; Bx
LVA-C 23	3 meses; paralisia MPs; hiperalgesia; procedência SP	desconhecido	Ba; Pul; Ln; SNC; Bx; LCR
LVA-C 24	3 meses; sinais gastroentéricos ; respiratórios; neurológicos	desconhecido	Ba; Pul; SNC; Bx; Rim; Timo; LCR; Urina
LVA-C 25	3 meses; sinais gastroentéricos; respiratórios; neurológicos	desconhecido	Ba; Pul; SNC; Bx; Fig; Rim
LVA-C 26	10 anos; sinais gastroentéricos e neurológicos	reforços anuais 2meses antes do óbito	SNC

MPs: membros posteriores; MAs: membros anteriores; Ba: baço; Pul: pulmão; Ln: linfonodo; SNC: sistema nervoso central; Bx: bexiga; LCR: líquido-céfaloraquidiano.

3.6. Processamento das Amostras

3.6.1. Tecidos

Aproximadamente 0,2g de cada amostra de tecido foi macerada em 2ml do Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM – E -Cultilab[®]) contendo 20µl de enrofloxacin a 10% e submetida à centrifugação (3000 x g/15min).

As amostras processadas foram acondicionadas a - 80°C.

3.6.2. Urina

A amostra de urina foi centrifugada (3000 x g/15 min) e o sobrenadante acondicionado em ependorfe identificado e mantido a -80°C até o momento do uso.

3.6.3. Líquido céfalo-raquidiano (LCR)

Após a coleta, as amostras de LCR foram centrifugadas (3000 x g / 15min), o sobrenadante foi acondicionado em ependorfe identificado e mantido a – 80°C até o momento do uso.

3.7. Isolamento Viral

Alíquota do sobrenadante de cada amostra de tecido processadas conforme descrição anterior (item 3.6.1) foi diluída dez vezes em uma solução de MEM-E contendo enrofloxacin 10% e filtradas com membrana de 0,45µm (Corning[®]). Utilizou-se 1 ml desta solução para

inoculação em garrafas de 75cm contendo monocamadas da célula Madin-Darby canine kidney (MDCK) com 24 horas de crescimento. As garrafas foram incubadas a 37°C por 1 hora para adsorção viral e ao fim deste período completou-se o volume com 7 ml da solução de MEM-E com enrofloxacin 10%. Utilizou-se o mesmo protocolo para o controle negativo (células sem inóculo) e para o controle positivo (células infectadas com a amostra padrão). As culturas foram observadas diariamente até o sétimo dia após a inoculação para visualização do ECP, as garrafas então eram congeladas a - 80°C, descongeladas, o conteúdo centrifugado (3000 x g/15 min) e 1 ml do sobrenadante inoculado em novo cultivo celular. Foram efetuadas dez passagens cegas para cada amostra.

3.8. Padronização da RT-PCR

3.8.1. Extração do RNA viral

Foram testadas duas técnicas distintas para a extração do RNA viral, descritas a seguir.

3.8.1.1. Técnica TRIzol® Reagent (Invitrogen, CA-USA)

Para cada 500µl do sobrenadante obtido do processamento dos tecidos (item 3.6.1), adicionou-se 1ml de trizol. Quando em cultivo celular, a monocamada celular infectada (item 3.7) com aproximadamente 20% de ECP ou com até 7 dias de cultivo foi congelada a - 80°C e descongelada, o conteúdo centrifugado a 3000 x g/ 15 min e 500µl do sobrenadante foram diluídos com 1ml de trizol.

A técnica foi realizada seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante.

3.8.1.2. Técnica “High Pure Viral Nucleic Acid” – (ROCHE®)

Um volume de 200µl do sobrenadante das amostras de tecido processadas conforme o item 3.6.1, assim como o mesmo volume de urina (item 3.6.2) e LCR (item 3.6.3) foram utilizados para o teste.

Quando em cultivo celular, a monocamada celular infectada (item 3.7) com aproximadamente 20% de ECP ou com até 7 dias de cultivo foi congelada a – 80°C e descongelada, o conteúdo centrifugado a 3000 x g/ 15 min e 200µl do sobrenadante foram utilizados para o teste.

A técnica foi realizada seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante.

3.8.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, CA, USA), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante.

Para cada reação com volume final de 20µl acrescentou-se 1µL de Random Primer (50ng/µl); 1µl de Anneling Buffer e 6µl de RNA total. A mistura foi aquecida a 65°C por 10 minutos e incubada em gelo por 1 minuto, centrifugada e então acrescida de 10 µl de 2x First Strand Reaction Mix e 2µl SuperScript™ III /RNaseOUT™ Enzyme Mix, novamente aquecida a 25 °C/ 10'; 50 °C/50' e 85 °C/5' e estocada a -20 °C.

3.8.3. Reação de PCR para a detecção do gene H

Para cada reação com volume final de 50µL contendo 2 µl de cDNA, foram acrescentados os seguintes reagentes nas concentrações finais: 1 x tampão de PCR (2µl), 10 mM de dNTP (0,2 mM de cada), 1,5mM de MgCl₂ (3µl), 10 pmol de cada iniciador H1 e H2 (1µl) e 2,5U da enzima Taq- polimerase (0,5µl) (Invitrogen, CA, USA).

A mistura foi aquecida por 5 minutos a 94° C para sofrer desnaturação. A amplificação foi realizada em um termociclador PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems®). O ciclo termal consistiu em desnaturação a 94° C durante 1 minuto, anelamento a 53°C durante 45 segundos e alongamento a 72°C durante 2 minutos. Foram realizados 35 ciclos de amplificação. O último ciclo de extensão foi prolongado por 10 minutos.

Seqüências do gene H depositas no GenBank foram usadas para desenhar os primers (**Quadro 2**). O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7% contendo 0,5mg de brometo de etídeo/ml de gel e usando 0,5x de tampão TBE, em voltagem constante (90V) por 40 min. O produto foi visualizado sob transiluminação ultravioleta e registrado com o equipamento Image Master VDS (Amershan Pharmacia®).

Quadro 2.- Descrição dos primers utilizados para o gene H de CDV

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Posição	Tamanho*
CDV-H1	GTT GCC ACA AAA RCT AAACGA	453	882
CDV-H2	CCT CCY AAG GGT TCC CAT GA	1196	

* Tamanho em pares de base (pb)

3.9. Sequenciamento genético

Primeiramente, os amplicons para a proteína H gerados na RT-PCR foram purificados com o GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckingham, UK), seguindo orientações do fabricante.

Utilizou-se para o sequenciamento o BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, USA), cuja reação consistiu de 2µl de Big Dye; 2µl do tampão Save Money 5x; 1 pmol de cada iniciador senso e antisenso em reações separadas; 1 ou 2µl de cada amostra, dependendo da intensidade da banda gerada com os produtos purificados, para um volume final de 10µl, levando-se ao termociclador PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems[®]) para aquecimento a 92 °C por 1 minuto e 30 ciclos de 96°C por 30 segundos; 50 °C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos seguido de resfriamento até 4 °C.

As amostras foram precipitadas utilizando 30µl água MilliQ[®] e 60µl de isopropanol P.A., mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugadas a 20000 x g a 17 °C por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e 150µl de isopropanol 75% foi adicionado. Novamente as amostras foram centrifugadas a 20000 x g a 17 °C por 10 minutos e secas.

A sequência de nucleotídeos foi determinada através de um sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, USA).

3.10. Análise filogenética

Para a obtenção da árvore filogenética foi usada a versão 7.01 do aplicativo BIOEDIT (Hall,1999). O alinhamento das sequências foi realizado com o aplicativo ClustalW, versão

1.83 (Thompson *e col.*, 1994). Imperfeições nos alinhamentos e erros das sequências foram manipulados minimamente usando a versão 7.01 do aplicativo BIOEDIT (Hall, 1999). A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de “neighbor-joining”, Kimura-2 parâmetros, através do programa de computador MEGA 3 (Kumar *e col.*, 1994), baseado na proporção das diferenças (distância p) existentes entre as seqüências estudadas. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências nucleotídicas do gene H de outros isolados de CDV obtidas no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>). Uma seqüência do gene H de morbilivírus isolado de focas (Phocine distemper virus) foi utilizada como grupo externo. Foram considerados como significativos valores de "bootstrap" superiores a 70%.

4. RESULTADOS

Os animais selecionados para este estudo apresentavam sintomatologia clínica sugestiva de cinomose. Dos dezesseis indivíduos testados, quatorze cães (LVA-C 04; LVA-C 05; LVA-C 06; LVA-C 09; LVA-C 13; LVA-C 18; LVA -C 19; LVA-C 20; LVA-C 21; LVA-C 22 ; LVA-C 23 ; LVA-C 24; LVA-C 25; LVA-C 26) apresentavam tanto sinais sistêmicos quanto neurológicos; um (LVA-C 10), apresentava apenas sinais sistêmicos e um (LVA-C 17), apenas sinais neurológicos, (**Quadro 1**).

4.1. Isolamento viral

Em todas as amostras de tecido testadas com o protocolo de isolamento adotado neste trabalho, não foram visualizados ECP em nenhuma das passagens em cultivo celular. A amostra viral utilizada como padrão também não apresentou ECP em cultivo celular (**Quadro 3**).

4.2. RT-PCR

Utilizando-se a técnica do TRIzol® Reagent (Invitrogen, CA-USA) para extração do RNA viral, das cinco amostras clínicas testadas, (LVA-C17; LVA-C 18; LVA-C 19; LVA-C 20; LVA-C 21), apenas uma, (LVA-C 20), apresentou resultado positivo na reação de RT-PCR para detecção do gene H do CDV (**Figura 3**). Porém, quando submetidas à extração com o HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID - ROCHE®, as mesmas cinco amostras foram positivas na reação de RT-PCR (**Figura 4**).

Quadro 3: Relação de indivíduos e amostras de tecidos submetidos a técnica de isolamento viral e o número de passagens em cultivo celular por amostra. ECP: efeito citopático; SNC: sistema nervoso central.

INDIVÍDUO	AMOSTRAS DE TECIDOS	PASSAGENS CELULARES	ECP
LVA-C 4	PULMÃO	10	negativo
LVA-C 4	LINFONODO	9	negativo
LVA-C 4	BAÇO	10	negativo
LVA-C 5	SNC	10	negativo
LVA-C 6	SNC	9	negativo
LVA-C 9	SNC	10	negativo
LVA-C 9	BEXIGA	1	negativo
LVA-C 9	LINFONODO	1	negativo
LVA-C 10	SNC	10	negativo
LVA-C 13	SNC	10	negativo
LVA-C 17	SNC	10	negativo
LVA-C 18	SNC	10	negativo
LVA-C 19	SNC	1	negativo
LVA-C 20	SNC	1	negativo
LVA-C 21	SNC	1	Negativo
CDV -LD	-	10	Negativo



Figura 3: Produto da reação de RT-PCR para do gene H de CDV. Região amplificada de 882 pb. Extração realizada com o Trizol. **M:** marcador de peso molecular de 1 Kb Plus; **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **C+:** controle positivo (CDV-LD); **1:** LVA-C17 (SNC); **2:** LVA-C18 (SNC); **3:** LVA-C19 (SNC); **4:** LVA-C20 (SNC); **5:** LVA-C21 (SNC).

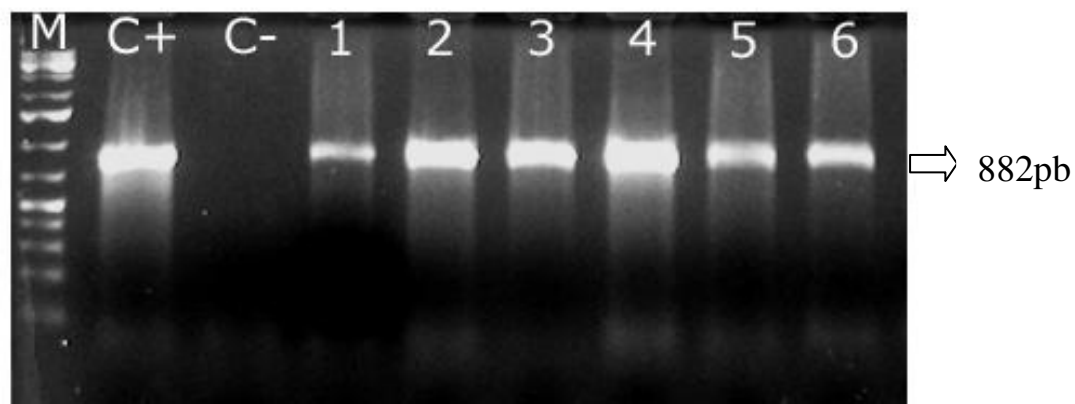


Figura 4: Produto da reação de RT-PCR para do gene H do CDV, utilizando a técnica de extração HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID - ROCHE®. Região amplificada de 882 pb. Extração realizada com o Kit Roche. **M:** marcador de peso molecular 1Kb Plus; **C+:** controle positivo (CDV-LD); **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **1:** LVA-C17 (SNC); **2:** LVA-C18 (SNC); **3:** LVA-C19 (SNC); **4:** LVA-C20 (SNC); **5:** LVA-C21 (SNC).

Em dez dos quatorze indivíduos testados pela técnica de RT-PCR para detecção do gene H, a presença do CDV foi evidenciada em pelo menos um dos órgãos avaliados de cada indivíduo (**Quadro 4**).

Em função da sintomatologia clínica neurológica ter sido a mais evidente entre os indivíduos selecionados, optou-se por priorizar as amostras de SNC. Das quatorze alíquotas de SNC coletadas, nove foram positivas pela técnica de RT-PCR para detecção do gene H (**Quadro 4**).

Amostras de outros tecidos foram coletadas, quando disponíveis, e submetidas ao teste de RT-PCR no intuito de investigar a presença de RNA viral em outros sistemas, além do SNC. Em relação a essas amostras encontrou-se: cinco amostras de baço e pulmão positivas em oito testadas; duas amostras positivas de bexiga em sete testadas; uma

amostra de linfonodo positiva em três testadas; duas amostras de rim positivas em duas testadas; uma amostra de fígado positiva em uma testada e uma amostra de timo positiva em uma testada (**Quadro 4**).

Dentre as amostras de secreção, na única alíquota de urina coletada detectou-se a presença do RNA viral, e as quatro amostras de LCR geraram resultados negativos (**Quadro 4**).

As amostras amplificadas apresentaram fragmentos compatíveis com aquele do controle positivo, de tamanho de 882 pb, correspondente à região selecionada para o gene da proteína H. Na reação referente ao controle negativo não houve amplificação de fragmento gênico (**Figuras: 5, 6, 7 e 8**).

Quadro 4: Relação das amostras de tecidos e secreções dos indivíduos testados pela RT-PCR para detecção do gene H e resultados. (+): positivo e (-): negativo

INDIVÍDUO	TECIDOS E SECREÇÕES	RT-PCR
LVA-C 5	SNC	-
LVA-C 6	SNC	-
LVA-C 9	SNC	+
LVA-C 10	SNC	-
LVA-C 13	SNC	-
LVA-C 17	SNC; Ba; Pul	+ (SNC)
LVA-C 18	SNC	+
LVA-C 19	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (SNC; Ba)
LVA-C 20	SNC; Ba; Pul; Bx	+ (SNC; Pul)
LVA-C 21	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (SNC)
LVA-C 22	SNC; Ba; Pul; Bx	+ (SNC; Ba; Pul)
LVA-C 23	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (Ba; Pul; Ln)
LVA-C 24	SNC; Ba; Pul; Bx; LCR; T; Rim; U	+ (todas; – LCR)
LVA-C 25	SNC; Ba; Pul; Bx; Fig; Rim	+ (todas)
LVA-C 26	SNC	-

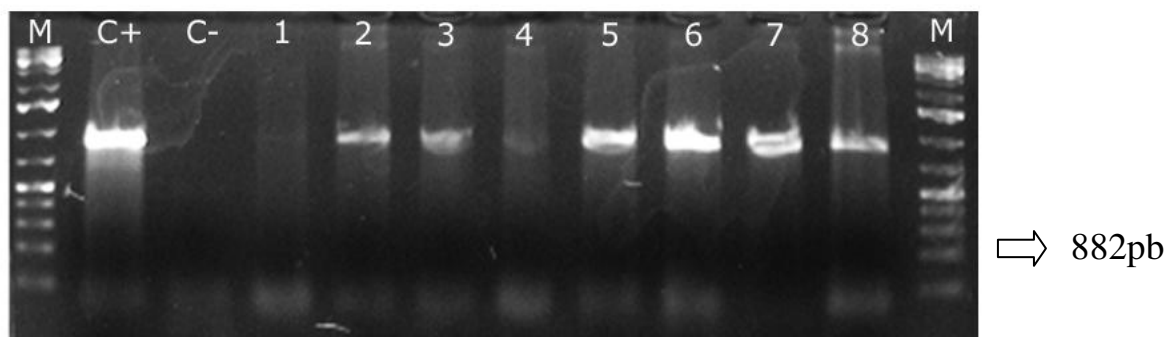


Figura 5: Produto da reação de RT-PCR para o gene H de CDV. Região amplificada de 882 pb. **M:** marcador de peso molecular 1 Kb Plus; **C+:** controle positivo (CDV-LD); **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **1:** LVA-C9 (SNC); **2:** LVA-C17 (SNC); **3:** LVA-C18 (SNC); **4:** LVA-C19 (SNC); **5:** LVA-C19 (Ba); **6:** LVA-C20 (SNC); **7:** LVA-C20 (Pul); **8:** LVA-C21 (SNC); **M:** marcador de peso molécula 1 Kb Plus.

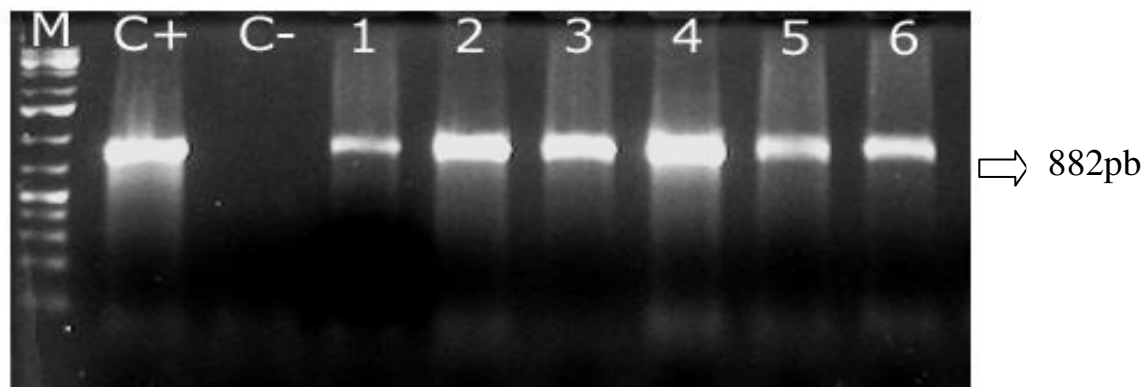


Figura 6: Produto da reação de RT-PCR para o gene H de CDV. Região amplificada de 882 pb. **M:** marcador de peso molecular 1 Kb Plus; **C+:** controle positivo (CDV-LD); **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **1:** LVA-C22 (SNC); **2:** LVA-C22 (Pul); **3:** LVA-C22 (Ba); **4:** LVA-C23 (Ba); **5:** LVA-C23 (Pul); **6:** LVA-C23 (Ln).

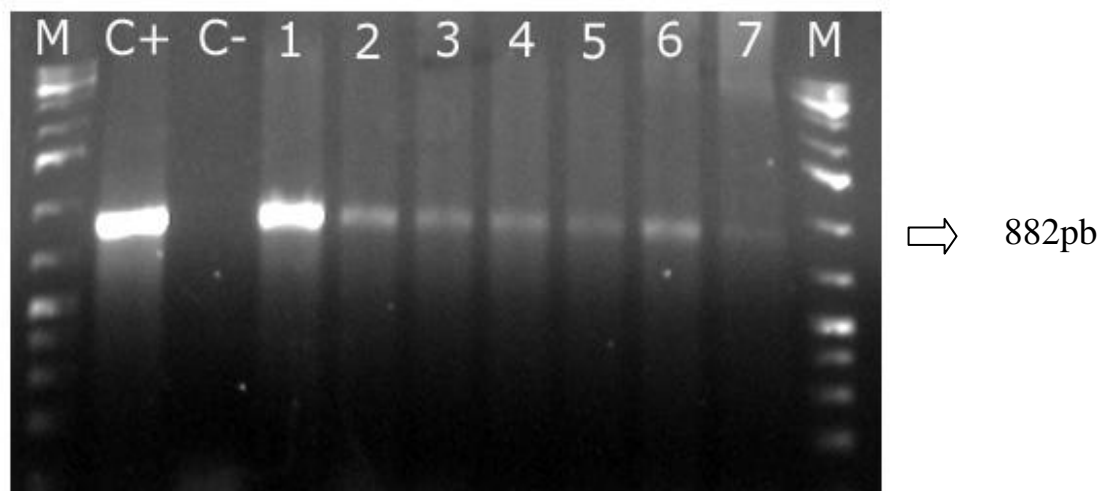


Figura 7: Produto da reação de RT-PCR para do gene H do CDV. Região amplificada de 882 pb. **M:** marcador de peso molecular 1 Kb Plus; **C+:** controle positivo (CDV-LD); **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **1:** LVA-C24 (SNC); **2:** LVA-C24 (Ba); **3:** LVA-C24 (Bx); **4:** LVA-C24 (Pul); **5:** LVA-C24 (Rim); **6:** LVA-C24 (Timo); **7:** LVA-C24 (Urina); **M:** marcador de peso molécula 1 Kb Plus.

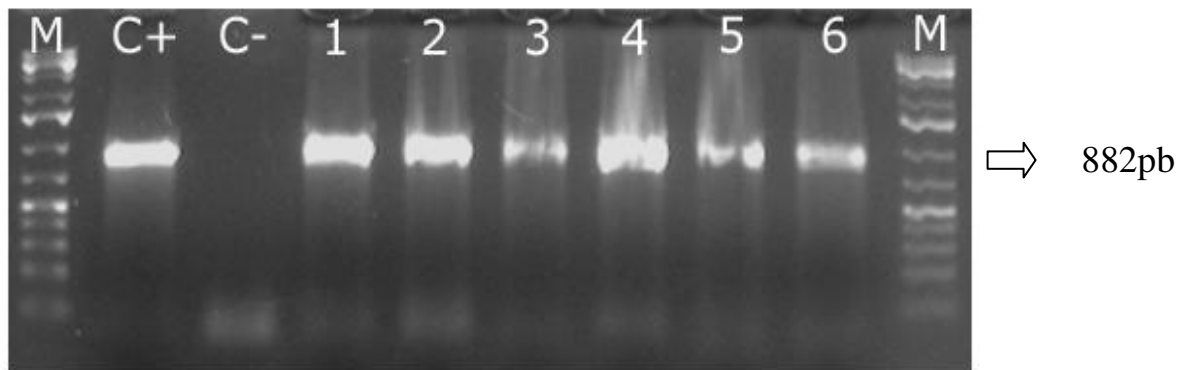


Figura 8: Produto da reação de RT-PCR para do gene H do CDV. Região amplificada de 882 pb. **M:** marcador de peso molecular 1 Kb Plus; **C+:** controle positivo (CDV-LD); **C-:** Controle negativo (LVA-C26); **1:** LVA-C25 (SNC); **2:** LVA-C25 (Ba); **3:** LVA-C25 (Bx); **4:** LVA-C25 (Pul); **5:** LVA-C25 (Fig); **6:** LVA-C25 (Rim); **M:** marcador de peso molécula 1 Kb Plus.

Alíquotas de cada uma das dez passagens em MDCK de SNC de três indivíduos positivos na RT-PCR foram submetidas ao mesmo teste. Apenas o produto da primeira passagem em cultivo celular do indivíduo LVA-C17 apresentou resultado positivo na RT-PCR. Em nenhuma outra passagem do mesmo indivíduo e nas dez passagens dos outros dois indivíduos testados houve amplificação de fragmentos pela RT-PCR.

4.3. Sequenciamento e Análise Filogenética

A análise das amostras sequenciadas revelou similaridade com outras amostras de CDV e as seqüências de nucleotídeos obtidas foram utilizadas para construir a árvore filogenética.

Na árvore filogenética não enraizada as amostras foram agrupadas próximas ao grupo das amostras italianas (DQ494317; DQ494319 e DQ494318), da amostra americana (AY964114) e das amostras japonesas (AB025271; AB191319; AB191322 e AB191321) e encontram-se geneticamente distantes das estirpes vacinais Snider Hill (AF259552) e Onderstepoort (D00758). Enquanto a estirpe Lederle foi agrupada junto às estirpes vacinais. (**Figura 10**)

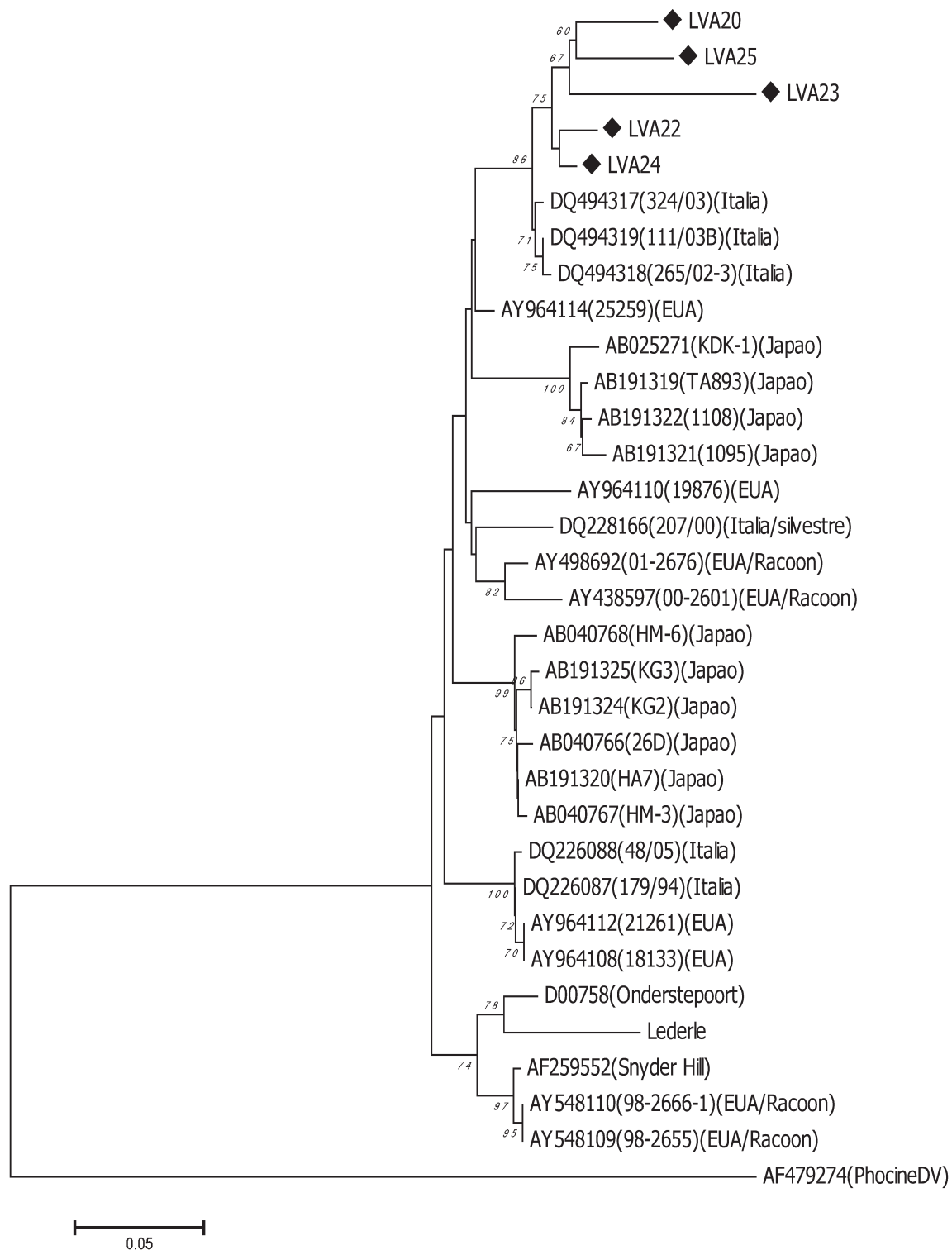


Figura 10: Árvore filogenética não enraizada utilizando a sequência de nucleotídeos de um segmento do gene que codifica a proteína H do CDV. As amostras analisadas estão marcadas com um losango.

5. DISCUSSÃO

Dez animais tiveram resultados positivos na RT-PCR para o gene H de CDV, destes, oito apresentavam sinais sistêmicos e neurológicos, um apresentou sinais sistêmicos e outro apenas sinais neurológicos. Com relação a idade, nove cães tinham idade que variavam de sessenta a cento e vinte dias e um, já adulto, tinha quatro anos. Sete filhotes foram comprados em feiras de animais, sendo dois procedentes de uma grande feira itinerante do estado de Santa Catarina. De acordo com dados de anamnese disponíveis, seis filhotes haviam recebido de uma a duas doses de vacinas polivalentes com antígenos de estirpes vacinais variadas do CDV. Tais informações refletem afirmações de Lan *e col.* (2006); Kim *e col.* (2006) e Sherding (1998) sobre sintomatologia, incidência e fontes de infecção.

Os dezesseis animais utilizados neste estudo foram eutanasiados em decorrência da evolução dos sintomas neurológicos, entretanto para os cinco indivíduos negativos na RT-PCR um diagnóstico definitivo não foi estabelecido. Sinais neurológicos diversos são comumente encontrados em casos de intoxicação por várias substâncias químicas (organofosforados), alterações anatômicas do SNC (displasia occipital, síndrome vestibular), secundário a alterações sistêmicas como hepato e nefropatias ou infecção por outros agentes como o vírus da raiva, por exemplo (Sherding, 1998).

Reconsiderações devem ser feitas com relação à adoção da presença do CDV em amostras de SNC (Krochowka *e col.*, 1987) estar diretamente associada ao diagnóstico positivo da infecção, uma vez que no indivíduo LVA-C 23 não detectou-se o vírus neste tecido, enquanto que em amostras de baço e pulmão material genético do CDV foi evidenciado pela RT-PCR.

O animal LVA-C 21, uma fêmea de quatro anos, foi admitida à internação apresentando sinais neurológicos do tipo cerebelares e vestibulares (ataxia; tremor de intenção da cabeça; nistagmo horizontal) os quais rapidamente evoluíram para tetraparesia, sem manifestação de sinal sistêmico. Pela RT-PCR, material genético do CDV foi encontrado apenas em alíquotas de SNC. Antígenos virais podem ser difíceis de serem encontrados em tecidos extraneurais em casos sem apresentação de sintomatologia sistêmica (Amude, *e col.*, 2006a). De acordo com Braund (1994), a ODE é uma síndrome clínica de baixa incidência causada pelo CDV, na qual os sinais sistêmicos normalmente estão ausentes. Summer *e col.* (1995) afirmaram que os CDV possuem predileção pela a substância branca do cerebelo e pedúnculo cerebelar. Amude *e col.* (2006b) fizeram um estudo clinicopatológico de vinte animais que apresentavam encefalite sem sinais sistêmicos característicos da cinomose, e, em 87,5% dos oito animais positivos para CDV os sinais cerebelares e vestibulares evoluíram pra tetraparesia.

Braund (1994) caracteriza a CDEID como a forma mais comum de apresentação da cinomose, onde a doença neurológica usualmente é precedida ou concomitante à sintomatologia sistêmica. Neste estudo, oito animais parecem se enquadrar nesta descrição. Possivelmente, o indivíduo LVA-C9 foi eutanasiado antes de iniciar as manifestações neurológicas.

A RT-PCR tem se mostrado um método rápido, sensível e específico pra o diagnóstico do CDV (Frisk, *e col.*, 1999; Von Messling *e col.*, 1999; Rzezutka & Mizak, 2002; Saito *e col.*, 2006; Shin *e col.*, 2004; Elia *e col.*, 2006; Amude *e col.*, 2006a; Gebara *e col.*, 2004; Kim *e col.*, 2006). A sensibilidade da RT-PCR varia com os primers utilizados, o método de extração de RNA e as amostras clínicas analisadas (Amude *e col.*, 2006b).

Os primers utilizados neste ensaio foram desenhados com base em seqüências gênicas da hemaglutinina de CDV depositadas no GenBank. Optou-se pelo gene H por possuir uma alta variação gênica entre as estirpes de CDV e, assim, ser o mais indicado para avaliar diferenças gênicas entre as amostras (Martella *e col.*, 2002; Martella *e col.*, 2006; Von Messling *e col.*, 2001; Blixenkrone-Moller *e col.*, 1992; Lan *e col.* 2006).

Para a extração do RNA viral duas técnicas foram testadas. A técnica que utiliza o kit HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID K - ROCHE® nas condições laboratoriais as quais foi submetida mostrou-se um método rápido, de mais fácil execução e mais eficaz quando comparado à técnica que utiliza o reagente trizol. Trata-se de uma técnica cujo protocolo de execução apresenta-se mais homogêneo, com um menor número de etapas e que requer um volume menor por amostra. Lan *e col.* (2006, 2005) utilizaram a técnica com trizol pra extração do RNA viral. Outros kits como Isogen-LS (Nippon Gene, Japão), NucleoSpin RNA II Kit (BD Biosciences, Inc., Palo Alto, CA) e RNeasy Kit (Qiagen, GMBH, Alemanha) têm sido descritos nos experimentos de Mochizuki *e col.* (1999); Pardo *e col.* (2005) e Matella *e col.* (2006), respectivamente.

De acordo com a disponibilidade e facilidade de coleta, amostras variadas de tecidos e secreções foram colhidas dos indivíduos suspeitos. Todos os indivíduos tiveram alíquotas de SNC testadas pela RT-PCR. Dos dez cães com resultados positivos para o CDV apenas um indivíduo (LVA-C 23) não foi positivo nas amostras de origem do tecido neurológico, já nas amostras de pulmão, baço e linfonodo foi positivo, ou seja, material genético do CDV foi detectado.

Amostra de urina foi colhida de um único indivíduo, LVA-C 24, e material genético do CDV foi detectado nesta secreção. Assim como em todas as outras amostras de tecidos

testadas deste animal, com exceção do LCR que apresentou resultado negativo na RT-PCR. Saito *e col.* (2006) amplificaram um fragmento do gene da NP do CDV a partir de amostras de urina nos vinte e dois caninos testados e sugeriram ser a urina mais sensível que o soro e leucócitos e tão sensível quanto o LCR, quando comparados os resultados. Amude *e col.* (2006c) baseando-se nos resultados de seus experimentos com cães sem sintomatologia característica de cinomose sugerem ser a urina uma boa amostra clínica para o diagnóstico *ante mortem* do CDV, assim como amostras de SNC. Entretanto, obtiveram resultados inexpressivos ao testar LCR, soro e sangue total periférico. Kim *e col.* (2006) não encontraram fragmentos do CDV em amostras de LCR em nenhum indivíduo testado durante todo o período pós-infecção avaliado, assim como Frisk *e col.* (1999) também encontraram resultados negativos no RT-PCR de LCR de animais com cinomose diagnosticada através de imunohistoquímica.

Com a técnica de detecção padronizada neste trabalho as quatro amostras de LCR de animais positivos para o CDV geraram resultados negativos. A pequena quantidade de RNA viral no LCR, a baixa celularidade do LCR (CDV pode estar extra ou intracelular no LCR) e o mecanismo de persistência do vírus no SNC podem contribuir para a baixa quantidade ou ausência do CDV no LCR (Amude *e col.*, 2006b).

Com relação aos resultados obtidos a partir das outras amostras de tecidos utilizadas neste experimento, estes estão de acordo com os resultados de Elia *e col.* (2006), onde em uma análise por real-time RT-PCR de várias amostras de tecidos e secreções de um cão positivo para CDV encontraram altas cargas virais em tecidos linfóides (tonsilas, baço, linfonodo mesentérico) e pulmão, além de terem encontrado material genético em todas as outras amostras testadas em menores quantidades.

A tentativa de isolamento viral a partir de amostras de diferentes órgãos ocorreu em insucesso e não visualização de ECP em nenhuma das passagens cegas, mesmo para as amostras de indivíduos positivos para o CDV pela RT-PCR. E quando testadas pela RT-PCR apenas a primeira passagem de material neurológico do indivíduo LVA-C 17 gerou um produto de 882 pb, resultado não encontrado para nenhuma das outras nove passagens do mesmo material.

A linhagem celular adotada para este trabalho, MDCK, foi também utilizada por Lednicky *e col.* (2004b) para o isolamento de CDV a partir de tecidos de guaxinins e recomendada por Appel & Gillespie (1972).

Lednicky *e col.* (2004a) testaram as linhagens MDCK, MV 1 LU e Vero para o isolamento de amostras de CDV a partir de tecidos de guaxinins. A detecção viral por RT-PCR ocorreu mais precocemente em células MDCK, entretanto o ECP foi mais evidente no material inoculado em células Vero.

Atualmente, indica-se o uso de células da linhagem Vero-DST, expressando um receptor para a proteína H do CDV (dogSLAM), a qual foi desenvolvida por Seki *e col.* (2003), e testada por Lan *e col.* (2006) e mostrou-se eficaz para o isolamento do CDV a partir de amostras clínicas, sem alteração genômica e/ou de virulência durante a adaptação e manifestação precoce de ECP.

Os resultados do sequenciamento genético submetidos à análise pelo BioEdit mostraram identidade com várias seqüências do CDV depositadas no banco de dados e sugerem que as seqüências amplificadas são seqüências do gene H do CDV.

Nos últimos anos, descobertas sobre características moleculares do gene H de CDV têm permitido identificar diferentes classes filogenéticas classificadas de acordo com sua origem geográfica (Ásia-1, Ásia-2, Europa, USA, Ártico) e/ou ao ano de identificação da amostra (América-1: 1930-1950; velhos CDVs; estirpes vacinais) (Martella *e col.*, 2002).

A análise filogenética baseada em um segmento de 570pb do gene H sugere que as amostras avaliadas neste estudo encontram-se geneticamente relacionadas à linhagem européia, onde estão agrupadas as amostras italianas identificadas entre os anos 2000 a 2004. Esse grupo encontra-se próximo à linhagem Ásia 1, onde estão agrupadas as amostras japonesa KDK-1 (1998) e uma amostra americana (AY964114) isolada em 2004.

A amostra Lederle, utilizada como padrão e também submetida ao sequenciamento, encontra-se no grupo das amostras vacinais (linhagem América-1). Tal estirpe foi isolada em 1951 de um cão com encefalite (ATCC) e é atualmente usada em vacinas comerciais para cães.

Mochizuki *e col.* (1999) sugerem que a importação de animais possa explicar a entrada de uma estirpe de CDV identificada em casos clínicos no Japão em 1999. Martella *e col.* (2006) também acreditam que o aumento do deslocamento global de animais possa ter propiciado o aparecimento de amostras incomuns de CDV na Itália. Pardo *e col.* (2005) especulam que a transmissão interespecies do CDV possa esclarecer a epidemia de cinomose em guaxinins no ano de 2001 estar associada a um vírus da linhagem Ártica.

Com relação ao status vacinal apenas para os indivíduos LVA-C 22 e LVA-C 19 referia-se duas doses de vacinas aplicadas aos sessenta e noventa dias de idade. O produto utilizado adota a estirpe Onderstepoort. Sobre os outros indivíduos nenhuma informação sobre vacinação prévia foi obtida.

De acordo com esses resultados, e à semelhança do que vem ocorrendo em países como Itália (Martella *e col.*, 2006), Japão (Mochizuki *e col.*, 1999) e EUA (Pardo *e col.*, 2005), genótipos distintos das estirpes vacinais estão circulando entre a população canina da região avaliada. Assim, o aumento da ocorrência da doença pode estar relacionado com as diferenças genótípicas entre as estirpes circulantes e as existentes nas vacinas atualmente utilizadas como método profilático contra a cinomose canina.

6. CONCLUSÕES

Em função da variabilidade e inespecificidade dos sinais clínicos, a cinomose deve ser considerada como diagnóstico diferencial em qualquer caso que sintomas neurológicos são manifestados.

Assim como um maior controle sobre a importação e exportação de animais é necessário a adoção de medidas sanitárias adequadas nos estabelecimentos que praticam o comércio de animais.

Os achados deste trabalho apontam para a ocorrência de estirpes do CDV geneticamente distintas daquelas rotineiramente utilizadas na produção de vacinas e estão em conformidade com relatos de outros países sobre a identificação de novos CDVs.

A efetividade das vacinas atualmente comercializadas pode ser comprometida pela extensão das variações genéticas e antigênicas observadas. Desta forma, mais estudos sobre os vírus selvagens em diversas regiões devem ser realizados para se conhecer mais detalhes sobre a filogenia do gene H do CDV, uma vez que a proteína H está complexamente envolvida com o mecanismo de neutralização viral e prevenção da infecção *in vivo*.

Um profundo esclarecimento da ecologia global do CDV propiciará bases para um maior controle da doença e da disseminação do vírus como também para a atualização das vacinas disponíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alldinger, S., W. Baumgärter, van Moll, P., Örvell, C.. In vivo and in vitro expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores. *Arch. Virol.*132:421-28, 1993.
- Amude, A. M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F.Clinicopaathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Veterinary Research Communications* Article in press. 2006 a.
- Amude, A. M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Veterinary Research Communications* 30: 679-687, 2006 b.
- Amude, A.M., Carvalho, G.A., Balarin, M.R.S; Arias, M.V.Bahr, Reis, A.C.F, Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. Canine distemper encephalomyelitis in dogs without systemic signs of the disease – preliminary studies in three cases. *Clínica Veterinária* ano IX, 60,60-66, 2006c.
- Appel, M. Canine distemper virus, *In* M.J.G. *Virus infections of carnivores*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 133-159, 1987.
- Appel, M.J., Gillespie, J.H. Canine distemper virus, *In* S.Gard, C.Hallauer, and K. F. Meyer, *Virology Monographs*. Springer-Verlag, New York, N.Y. 11:91-96, 1972.

- Appel, M.J., Summers, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol.* 44:187-191,1995.
- Appel, M. J., Yates, R. A., Foley, G. L., Bernstein, S., Santinelli, S., Spelman, L.H., Miller, L. D., Arp, L. H., Anderson, M., Barr, M., Pearce-Kelling, S., Summers, B. A. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:277-288, 1994.
- Axthelm, M.K.& Krakowka, S. Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathol.* 75, p.27-33,1987.
- Baumgärtner, W., Örvell, C., Reinacher, M. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathologica* 78 (5):504-512, 1989.
- Blixenkrone-Møller, M., Svansson, M., Appel, V., Krogsrud, M.J.G., Have, P., Orvell, C. Antigenic relationship between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Archives of Virology* 123:279-294,1992.
- Blixenkrone-Møller, M., Svansson, Have, P., Orvell, C., Appel, M., Pedersen, I.R., Dietz, H.H., Henriksen, P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microbiol.* 37:163-173, 1993.
- Braund, K.G., *Clinical syndromes in veterinary neurology*. 2^a ed. St. Louis: Mosby, 1994, 477p.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., Cattaneo, R. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J.* 17:3899-3908, 1998.

- Easton, A.J., Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. (2004). Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 390-412.
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M.S., Lorusso, E., Trani, L., Buonavoglia, C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virology Methods* 136 (1-2):171-176, 2006.
- Evermann, J.F., Leathers, C. W., Gorham, J.R., McKeirnan, A. J., Appel, A.J. Pathogenesis of two strains of lion (*Panthera leo*) morbillivirus in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet. Pathol.* 38:311-316, 2001.
- Frisk A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology.* 37(11): 3634-43, 1999.
- Gebara, C.M.S., Wosiacki, S.R., Negrão, F.J., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. Lesões histopatológicas no sistema nervosa central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 56 (2):168-174, 2004.
- Gemma, T., Iwatsuki, K., Shin, Y.K., Yoshida, E., Kai, C., Mikami, T. Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *J. Vet. Med. Sci.* 58(8):791-4, 1996.
- Greene, C.E., Apple, M.J. Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Disease of the Dog and Cat* second ed. WB Saunders, Philadelphia, 9-22, 1998.
- Griffin, D.E. & Bellini, W.J. Measles Virus. In: *Fields Virology*, 3 ed. Edited by B.N. Fields, DM Knipe, PM Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1313-1351, 1996.

- Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., Barrett, T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus res.* 48: 165-171, 1997.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and anlysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.
- Harder, T.C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., van Amerongen, G., Örvell, C., Barret, T., Appel, M.J.G., Osterhaus A.D.M.E. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77: 397- 405, 1996.
- Hashimoto, M., Une, Y., Mochizuki, M. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch. Virol.* 146: 149-155, 2001.
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y.S., Mori, T., Hirayama, C., Kai, C. Mikami, T. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol.* 78:373-380, 1997.
- Jó'zwik, A., Frymus, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary Research Communications* 29: 347-359, 2005.
- Krakovka, S., Axthelm, M.K., Johnson, C.G. Canine distemper virus. In Olsen, R.G., Krakowka, S., Blakeslee, J.R. (Eds.), *Comparative pathobiology of viral disease* 2:137-164, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla, 1985.
- Krakovka, S., Cork, L.C., Winkelstein, J.A., Axthelm, M.K. Estalishment of central nervous sistem infection by canine distemper virus; breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet. Immunol. Immunopath.* 17: 471-82, 1987.

- Kim, Y.H., Cho, K.W., Youn, H.Y., Yoo, H.S., Han, H.R. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci* 2: 59-63, 2001.
- Kim, D., Jeoung, S.Y., Ahn, S.J., Lee, J.H., Pak SII., Kwon, H. M. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 68(8):877-879, 2006.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150-163, 2004.
- Lan, N. T., Yamaguchi, R., Kawabata, A., Uchida, K., Kai, K., Sugano, S., Tateyama, S. Stability of canine distemper virus (CDV) alter 20 passages in Vero-DST cells expressing the receptor protein for CDV. *Veterinary Microbiology.* 118(3-4):177-188, 2006. Lan, N. T., Yamaguchi, R., Kai, K., Uchida, K., Kato, A., Tateyama, S. The growth profiles of three types of canine distemper virus on vero cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule. *J. Vet. Med. Sci* 67 (5):491-495, 2005.
- Lamb, R. A. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197:1-11, 1993.
- Lednicky, J.A., Meehan, T. P., Kinsel, M.J., Dubach, J., Hungerford, L.L., Sarich, N.A., Witecki, K.E., Braid, M.D., Pedrak, C., Houde, C. M. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phosphor protein genes. *Journal Virological Methods* 118:147-157, 2004.
- Lednicky, J.A., Dubach, J., Kinsel, M.J., Meehan, T. P., Bocchetta, M., Hungerford, L.L., Sarich, N.A., Witecki, K.E., Braid, M.D., Pedrak, C., Houde, C. M. Genetically distant American *Canine distemper virus* lineages have recently caused epizootics with

- somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virology Journal* 1:2, 2004b.
- Martella, V., Cirone, F., Elia G.; Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M. S., Bellacicco A.L., Blixenkrone-Moller, M., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology*. 116(4):301-309, 2006.
- Martella, V., Pratelli, A., Cirone, F., Zizzo, N., Decaro, N., Tinelli, A., Foti, M., Buonavoglia, C. Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and Cellular Probes* 16:77-83, 2002.
- Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (9):2936-2942, 1999.
- Moro, L., Martins, A.S., Alves, C.M., Santos, F.G.A., Del Puerto, H.L., Vasconcelos, A.C. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J.Vet.Med.B*.50:221-25, 2003.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., Studdert, M. J. *Veterinary Virology*, 3rd ed., 411-428. Academic Press, San Diego, Calif. 1999.
- Pardo, I.D.R.; Johnson, G.C.; Kleiboeker, S.B., Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43(10), p. 5009-5017, 2005.
- Rzezutka, A., Mizak, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology*. 88: 95-103, 2002.
- Saito, T.B., Alfieri, A.A., Wosiacki, S.R., Negrão, F.J., Morais, H.S.A., Alfieri, A.F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in

- the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science* 80:116-119, 2006.
- Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi, R., Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J. Virol.* 77:9943-9950, 2003.
- Schimid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J. Virol.* 74:7554-7561, 2000.
- Sherding, R.G. Cinomose . In: Bichard, S.J.; Sherding, R. G. Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. 1ªed. São Paulo: Roca Ltda, 1998. Cap. 6: 120-123.
- Shin, Y.J., Cho, K.O., Cho, H.S., Kang, S.K., Kim, H.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Park, N.Y. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust. Vet. J.* 82:83-86, 2004.
- Shin, Y.S., Mori ,T., Okita, M., Gemma, T., Kai, C., Mikami, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 57:439-45, 1995.
- Shin, Y.S., Mori, T., Tomonaga, K., Iwatsuki, K., Kai, C., Mikami, T. Expression of the nucleocapsid protein gene of the canine distemper virus. *J. Vet. Med. Sci.* 59:51-53, 1997.
- Sidhu, M.S., Chan, J., Kaelin, K., Spielhofer, P., Radecke, F., Schneider, H., Masarekar, M., Dowling, P.C., Billeter, M.A., Udem, S. A. Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology* 208:800-807.

- Sidhu, M.S., Husar, W., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology*. 193:66-72, 1993.
- Summer, B.A., Cummings, J.F., de Lahunta, A. *Veterinary neuropathology*. Mosby, St. Louis, 102-110, 1995.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22(22):4673-4680, 1994.
- Vandeveld M., Zurbriggen, A., The neurobiology of canine distemper virus infection. *Vet. Microbiology* 44:271-280, 1995.
- Van de Bilt, M.W., Kuiken, T., Visee, A. M., Lema, S., Fitzjohn, T.R., Osterhaus, A.D. Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg. Infect.Dis.* 8:211-213, 2002.
- Visser, I.K., Kumarev, V.P., Örvell, C., de Vries, P., Broeders, H.W.J., Van de Bilt, M.W.G., Groen, J., Teppema, J.S., Burger, M.C., Uyterhaag, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E. Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North Europe and Siberia. *Arch.Virol.* 111:149-164, 1990.
- Von Messling, V., Harder, T.C., Moenning, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4):1049-56, 1999.
- Von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*. 75 (14): 6418-6427, 2001.

- Wild, T.F., Nanche, D., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., Malvoisin, E., Leucouturier, V., Buckland, R. Mode of entry of morbillivirus. *Veterinary Microbiology* 44(2-4):267-270, 1995.
- Zurbriggen, A., Schmid, I., Graber, H., Vandewelde, M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol.* 95:71-77, 1998.